

CRYOCONSERVATION DU CONCHOCELIS DE *PORPHYRA LINEARIS* (RHODOPHYCEAE)

S. ARBAULT et G. DELANOUE

IFREMER, Centre de Nantes, DRV/RA
rue de l'Île d'Yeu, BP 1049 - Nantes Cedex 01, France

RÉSUMÉ. - Des recherches sur la possibilité de conserver dans l'azote liquide les filaments de conchocelis ont été réalisées à partir de l'algue rouge *Porphyra linearis* Greville. Deux cryoprotecteurs ont été utilisés, l'un pénétrant dans la cellule: le diméthylsulfoxyde (DMSO), l'autre non ou peu pénétrant: le saccharose. Les résultats ont été similaires. L'intégrité cellulaire a été déterminée en mesurant l'activité estérase de la membrane plasmique par le test à la fluorescéine diacétate (FDA). Aucune survie n'est obtenue sans emploi de cryoprotecteur. La technique mise au point permet une survie de 70%, suffisante pour la conservation de la souche après une période de récupération de 14 à 21 jours, nécessaire à la cellule pour retrouver un métabolisme normal.

ABSTRACT. - The feasibility of preserving the conchocelis phase in liquid nitrogen has been investigated in the red alga *Porphyra linearis* Greville using two cryoprotective agents which gave similar results: dimethyl sulfoxide (cell-penetrating) and sucrose (non penetrating). Cell viability was assayed by fluorescein diacetate determination of esterase activity. No survival was obtained without cryoprotective agent. A survival rate of 70% was obtained. It is sufficient to recreate the initial colony. Cells showed normal metabolism after a 14 to 21 days recovery period.

MOTS-CLÉS. - Algue, cryoconservation, conchocelis, *Porphyra linearis*.

INTRODUCTION

Le genre *Porphyra* comprend des espèces qui font partie des algues alimentaires les plus consommées en Extrême-Orient car elles présentent un taux élevé de protéines (jusqu'à 43% du poids de matière sèche), un faible pourcentage de lipides (2%) ainsi qu'une forte teneur en sels minéraux et en vitamines (Kazutosi *et al.*, 1987). Un marché de ce type d'algues se développant en Occident, il est envisagé de cultiver sur les côtes bretonnes l'espèce *Porphyra linearis* Greville qui, par sa forme lancéolée, et son crampon fortement excentré, paraît être la mieux adaptée aux techniques de culture actuelle. L'objectif ne pourra être atteint que si on parvient à disposer en permanence de filaments de conchocelis pour réaliser les ensemencements. Le conchocelis est le stade microscopique du *Porphyra*; il est à l'heure actuelle cultivé en laboratoire.

Ces filaments sont conservés en "free-living" (Perez *et al.*, 1992), c'est-à-dire en suspension, ce qui les expose à des contaminations par des agents pathogènes ou compétiteurs et à des taux plus faibles de formations de conchospores. Ces inconvénients

pourraient être évités si, au lieu de garder les conchocelis en "free living", nous parvenions à les conserver dans l'azote liquide tout en maintenant intactes leurs capacités à produire des conchospores.

Des essais réussis de cryoconservation ont porté sur l'algue *Undaria pinnatifida* au stade gamétophytes et spores (Arbault *et al.*, 1990; Renard *et al.*, 1992) et de nombreux travaux ont été réalisés sur les microalgues (Ben Amotz & Gilboa, 1980a et b).

Nous décrivons ici les expériences que nous avons menées dans cette optique et qui nous conduiront à proposer une méthode de cryoconservation efficace.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le développement complet de l'algue *Porphyra linearis* (Fig. 1) comporte l'alternance de deux générations morphologiquement différentes: le thalle macroscopique haploïde, se présente sous la forme d'une lame allongée et lobée sur son pourtour. A maturité, il produit des gamètes dont la fusion engendre des zygotes. Ces derniers se développent sur le thalle femelle, se divisent en éléments unicellulaires, les carpospores qui sont émises dans le milieu. La carpospore germe en un filament microscopique unisériel, finement ramifié, appelé conchocelis, qui représente la phase diploïde. Au terme de son évolution, le conchocelis génère des sporocystes dans lesquels se différencient après réduction chromatique¹, des cellules appelées conchospores. Celles-ci sont émises dans le milieu marin et germent après s'être fixées en plantules haploïdes.

Au laboratoire, les filaments de conchocelis obtenus à partir de carpospores sont conservés dans des ballons et maintenus en suspension au moyen d'un bullage dans un milieu nutritif, ESP Provasoli (1957), à une température comprise entre 15 et 20°C et sous un éclairage de 40 à 50 $\mu\text{mol.m}^{-2} \text{s}^{-1}$ jusqu'au moment de leur utilisation.

Préparation des échantillons - Quatre ml de la suspension de conchocelis sont placés dans des tubes cryobiologiques (Poly Labo, Strasbourg). Ceux-ci sont centrifugés à 500 tours min^{-1} pendant 5 minutes, puis le surnageant est éliminé.

Deux types de témoins sont préparés: le premier est constitué par du matériel issu directement de culture à 20°C, le second par des filaments ayant été congelés sans cryoprotecteur puis remis en culture.

Des tests préalables (fig. 2 a et b) ont permis de sélectionner les cryoprotecteurs les moins agressifs vis-à-vis de la cellule de conchocelis et de déterminer la concentration, la température, la méthode d'utilisation et le temps d'imprégnation qui sont les plus efficaces.

Le choix s'est porté sur deux cryoprotecteurs:

- le Diméthylsulfoxyde (DMSO) en solution en eau de mer à 15%; ce cryoprotecteur pénètre dans la cellule. Le DMSO est ajouté progressivement à raison de 0,2 ml toutes les 6 minutes et ceci pendant une heure (Dereuddre *et al.*, 1986). A chaque ajout, les filaments de conchocelis sont remis en suspension;

¹La place de la réduction chromatique n'a pas été définie avec certitude. Elle pourrait s'effectuer en deux temps: la première étape au sein du sporocyste, la deuxième étape au moment de la germination de la conchospore.

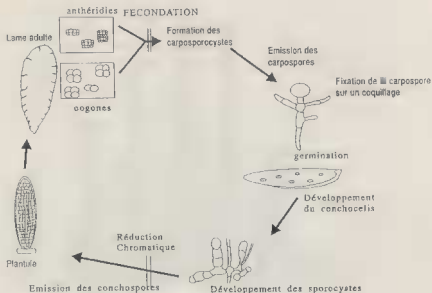


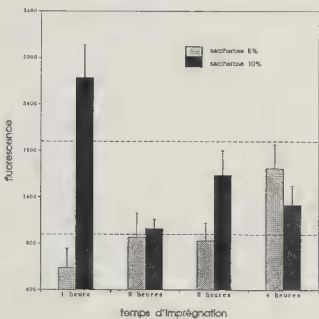
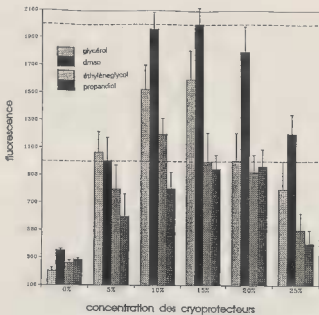
Figure 1: Cycle de reproduction de *Porphyra* sp.

- le saccharose ■ solution en eau de mer à 10%; ce cryoprotecteur ne pénètre pas ou peu dans la cellule, il est mélangé en une seule fois au culot de conchocelis.

L'imprégnation est effectuée à température ambiante, autour de 20°C.

Congélation - Les échantillons sont alors placés dans la chambre de refroidissement d'un congélateur programmable (Minicool, LC40, Air liquide, Sassenage). Ils sont refroidis jusqu'à -196°C en deux étapes selon le protocole préconisé par Gilboa & Ben Amotz (1980 a, b) et Dereuddre *et al.*, (1986). La première phase amène progressivement les échantillons jusqu'à la température de -40°C à une vitesse de 5°C min⁻¹; la deuxième consiste à passer de -40°C à -196°C en les plongeant directement dans l'azote liquide, pendant 15 à 20 minutes, les tubes sortant du Minicool. Ils sont ensuite disposés au-dessus des vapeurs d'azote dans un réservoir de stockage jusqu'à la décongélation.

Décongélation - A la sortie des vapeurs d'azote, les tubes sont plongés pendant 30 secondes dans un bain-marie à 40°C et agités pour accélérer les échanges thermiques (Renard, 1989). Le contenu de chacun est versé dans un tube de 50 ml. On incorpore alors 0,4 ml d'eau de mer stérile toutes les 6 minutes pendant une heure pour diluer progressivement le cryoprotecteur sans provoquer de choc osmotique. De l'eau de mer stérile est ensuite ajoutée jusqu'à l'obtention d'un volume de 50 ml. Au bout d'une heure, les tubes sont centrifugés à 3500 tours min⁻¹ pendant 5 minutes puis le surnageant éliminé. Le culot de conchocelis est transféré dans un ballon de 500 ml contenant de l'eau de mer stérile.



Remise en culture - Les ballons sont stockés sans bullage dans une armoire de culture sous une faible intensité lumineuse ($2 \mu \text{ mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), appliquée en continu, et à une température de 20°C . Le milieu de culture est changé chaque semaine pour éliminer toute trace du cryoprotecteur. Au bout d'une vingtaine de jours, on augmente l'intensité lumineuse jusqu'à atteindre $50 \mu \text{ mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Les ensemencements sur coquille deviennent alors possibles.

Estimation de la survie cellulaire - Pour vérifier l'état des filaments, deux méthodes ont été utilisées. La première consiste à suivre le développement du conchocelis en culture par observation microscopique, la seconde a recours à la colorimétrie. Gilbert (1990) a montré que le marqueur FDA (fluorescéine diacétate) est nettement plus efficace sur les algues que les marqueurs colorimétriques tels que le diméthylthiazol - diphényltétrazolium bromide - (Cigma Chemical Company M-2128 (MTT)) ou le rouge neutre. De plus, le FDA, molécule apolaire et non fluorescente, est hydrolysé à l'intérieur des cellules par une activité estérase non spécifique. Le produit de cette dégradation est la fluorescéine, fluorescente et polaire. Cette fluorescence est le reflet mesurable de l'activité métabolique. L'utilisation d'un lecteur de microplaque (Fluoroskan II, Labsystems) apporte une grande rapidité d'exécution, une excellente réplicabilité; il permet en outre de suivre un grand nombre d'échantillons. Le protocole de marquage consiste à placer en incubation pendant 3 heures $250 \mu \text{l}$ de suspension cellulaire associés à $10 \mu \text{l}$ de solution de FDA. Ceci est réalisé dans des plaques en propylène transparent comportant 96 puits de $400 \mu \text{l}$. Les mesures sont effectuées juste après la décongélation puis 24 h, 48 h, 3 j, 6 j, 12 j, 14 j... et 72 j après celle-ci.

RÉSULTATS

La comparaison entre, d'une part, le comportement des filaments cultivés en boîtes de Petri et, d'autre part, l'intensité de la fluorescence estérasique à laquelle il correspond, a permis de déterminer des degrés de fluorescence.

On a pu ainsi identifier pour *Porphyra linearis* (fig. 3), trois niveaux:

1) une fluorescence inférieure à 1000 signifie que les cellules sont en mauvais état et vont mourir à plus ou moins longue échéance si elles sont manipulées juste après la décongélation, 2) une fluorescence comprise entre 1000 et 2000 révèle que les conchocelis se trouvent dans une phase délicate de récupération métabolique, 3) une fluorescence entre 2000 et 3500 fournit la certitude que les cellules sont revenues, ou sont sur le point de revenir, à un métabolisme normal; leur survie est assurée.

Le graphique (fig. 4 a et b) met en évidence le rôle indispensable du cryoprotecteur. En effet, les échantillons témoins congelés sans cryoprotecteur donnent après décongélation une fluorescence en-dessous du seuil de survie. Cette intensité de fluores-

Figure 2 - a- Détermination de l'effet de la toxicité des cryoprotecteurs pénétrant dans les cellules (glycérol, DMSO, éthylèneglycol, propanediol) 21 jours après la décongélation, pour un même temps d'imprégnation (1 heure).

b- Détermination de la toxicité d'un cryoprotecteur non pénétrant dans les cellules en fonction de son temps d'imprégnation: le saccharose.

cence diminue avec le temps. Les filaments passent du rouge au brun-vert puis au blanc après la mort cellulaire.

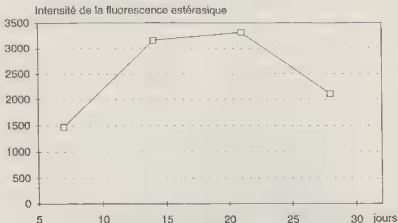


Figure 3: Evolution de l'intensité de fluorescence du conchocelis après décongélation.

Pour les cellules imprégnées par le DMSO 15%, la fluorescence mesurée juste après la décongélation est certes inférieure à 1000 mais elle augmente progressivement pour dépasser le seuil de survie vers le 7ème jour. On obtient un résultat identique lorsqu'on utilise comme cryoprotecteur (non pénétrant), le saccharose à 10%.

Il faut attendre de 14 à 21 jours après la décongélation pour mesurer une fluorescence supérieure à 2000 indiquant que la culture a retrouvé un métabolisme normal. Après ce palier, la baisse de fluorescence est due au confinement, les conchocelis étant laissés en culture dans les microplaques de mesure.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Le protocole que nous avons suivi pour cryoconserver le conchocelis de *Porphyra linearis* a permis d'obtenir un taux de survie de 70% et la reprise de la multiplication des filaments en "free-living". Il a été testé avec succès sur d'autres espèces de *Porphyra*: *P. yezoensis* et *P. tenera* (Kaas, comm. pers.). Ce taux a été obtenu par rapport à l'intensité de fluorescence du témoin non congelé et celle de la culture traitée 21 jours après la décongélation.

Il faut cependant insister sur l'importance du temps de reprise. Pendant les quatorze jours qui suivent la décongélation (fig. 3), les cellules affaiblies par le choc thermique ne doivent subir aucun stress (manipulations, agitation forte, intensité lumineuse, broyage). Toute intervention à ce stade se traduit invariablement par une dégénérescence des cellules. Elles doivent être stockées pendant cette période dans de l'eau de mer stérile, sans bullage, sous une très faible intensité lumineuse (2.10^{-6} mol $m^{-2} s^{-1}$) et à 20°C.

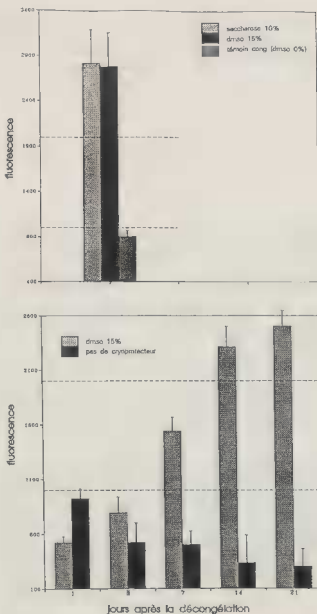


Figure 4: a- Intensité de fluorescence après décongélation, de conchocelis traité par divers cryoprotecteurs et non traité.

b- Intensité de fluorescence durant les jours suivant la décongélation, de conchocelis traité ou non par le DMSO.

Il est envisagé de suivre le devenir de ce conchocelis qui a été cryoconservé jusqu'à la production de conchospores et de plantules pour déceler des modifications physiologiques ou génétiques qui pourraient apparaître au niveau de la descendance après les différents traitements (Augereau *et al.*, 1986). Ces variations seraient la conséquence de l'introduction de cryoprotecteurs. Il est envisageable de les utiliser à des concentrations plus faibles ou d'employer des cryoprotecteurs non pénétrants, d'améliorer certaines étapes de la cryoconservation: température d'imprégnation, vitesses de congélation et de décongélation.

On notera l'intérêt d'utiliser la méthode de fluorescence qui permet de suivre l'activité estérasique et ainsi de mesurer rapidement l'influence de chaque paramètre intervenant dans la cryoconservation.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ARBAULT S., RENARD P., PEREZ R. & KAAS R., 1990 - Essai de cryoconservation des gamétophytes de l'algue alimentaire *Undaria pinnatifida* (Laminariales). *Aquat. Living Resources* 3: 207-215.
- AUGEREAU J.M., COURTOIS D. & PETIARD V., 1986 - Conservation des souches de cellules productrices de métabolites. *Bull. Soc. France* 133, *Act. bot.*, 3: 65-74.
- BEN AMOTZ A. & GILBOA A., 1980a - Cryoconservation of marine unicellular algae. I. A survey of algae with regard to size, culture age, photosynthetic activity and chlorophyll to cell ratio. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 2: 157-161.
- BEN AMOTZ A. & GILBOA A., 1980 b - Cryoconservation of marine unicellular algae. II. Induction of freezing tolerance. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 2: 221-224.
- DEREUDRE J., KARTHA K. & GAZEBAU C., 1986 - Cryoconservation des méristèmes. *Bull. Soc. Bot. France* 133, *Actual. Bot.*, 3: 75-88.
- GILBERT F., 1990 - Test écotoxicologique sur microalgues et lecteur de plaques: mesures d'activité enzymatiques sur cellules *in vivo*. Application à l'évolution de la qualité du milieu. Rapport de DEA d'océanographie, Université d'Aix-Marseille II. 39 p.
- KAZUTOSI N., NADA I., KIKUCHI R. & WATANA T., 1987 - The main seaweed food in Japan. *Hydrobiologia* 151-152: 5-29.
- PEREZ R., KAAS R., CAMPELLO F., ARBAULT S. & BARBAROUX O., 1992 - La culture des algues marines (*Phycoculture*) dans le monde. IFREMER, 614 p.
- PROVASOLI L., Mac LAUGHLIN J.J.A. & DROOP M.R., 1957 - The development of artificial media for marine algae. *Arch. Microbiol.*, 25: 392-498.
- RENARD P., 1989 - Etudes sur la cryoconservation des embryons de bivalves à des fins aquacoles. Thèse de doctorat de l'université de Paris VI, es Sciences naturelles: 77 p.
- RENARD P., ARBAULT S., KAAS R. & PEREZ R., 1992 - Une méthode pour la cryoconservation des gamétophytes de l'algue alimentaire *Undaria pinnatifida* (Laminariales). *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci.* t. 315, Série III, p. 445-451.